

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年 9 月 1 日 (01.09.2005)

PCT

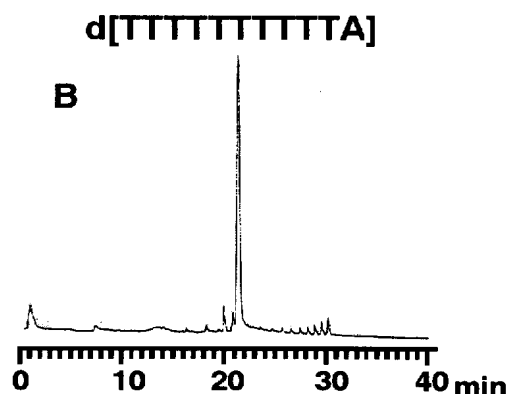
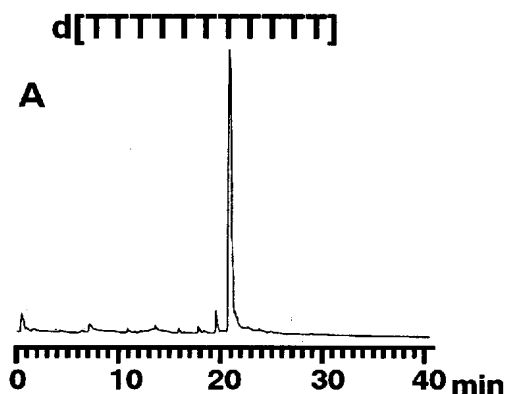
(10) 国際公開番号
WO 2005/080411 A1

- (51) 国際特許分類: C07H 21/04, C07F 9/6558, 9/6561, C12N 15/11
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/002058
- (22) 国際出願日: 2005 年 2 月 10 日 (10.02.2005)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願2004-049312 2004 年 2 月 25 日 (25.02.2004) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒3320012 埼玉県川口市本町四丁目 1 番 8 号 Saitama (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 関根 光雄 (SEKINE, Mitsuo) [JP/JP]; 〒2250011 神奈川県横浜市青葉区あざみ野 1-2 6-4 6 Kanagawa (JP). 清尾 康志 (SEIO, Kohji) [JP/JP]; 〒2270054 神奈川県青葉区しらとり台 4 8-5 第 2 パークサイド内田 1 0 2 Kanagawa (JP). 大窪 章寛 (OHKUBO, Akihiro) [JP/JP]; 〒1940003 東京都町田市小川 1-1 0-5-2 0 2 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 阿部 正博 (ABE, Masahiro); 〒2740825 千葉県船橋市前原西二丁目 1 4 番 1 号ダイアパレス津田沼 1 0 0 1 号 Chiba (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,

[続葉有]

(54) Title: 3' -TERMINAL NUCLEOSIDE UNIT CONTAINING PHOSPHORAMIDITE

(54) 発明の名称: ホスホロアミダイトを含む 3' 末端ヌクレオシドユニット



(57) Abstract: It is intended to provide a method of binding a 3' -terminal nucleoside to a hydroxyl group on a solid phase under the same conditions as in a DNA chain extension reaction. A 3' -terminal nucleoside unit containing phosphoramidite which is a compound represented by the following general formula (I): (N)-O-(R1)Si(R2)-(C6H4)-(CH2)n-O-P(OR3)N(R4)(R5) wherein (N) stands for an arbitrary nucleoside or its derivative; R1, R2, R4 and R5 are each an alkyl group or an aryl group; R3 is a phosphate-protecting group; and n is an integer of from 1 to 5; a solid phase support having a 3' -terminal nucleoside unit, which is the above compound, transferred thereinto; and a method of synthesizing a nucleic acid oligomer with the use of this solid phase support.

(57) 要約: 本発明の目的は、DNAの鎖長伸長反応と全く同一の条件で、任意の塩基を含む 3' 末端ヌクレオシドを固相上の水酸基に結合する方法を提供することである。本発明は、以下の一般式 (I) で示される化合物である、ホスホロアミダイトを含む 3' 末端ヌクレオシドユニット: (N)-O-(R1)Si(R2)-(C6H4)-(CH2)n-O-P(OR3)N(R4)(R5) (I) (式中、(N)は任意のヌクレオシド又はその誘導体であり、R1、R2、R4及びR5はアルキル基又はアリール基であり、R3はリン酸基の保護基であり、nは1~5の整数である)、該化合物である 3' 末端ヌクレオシドユニットが導入されている固相担体、及び、該固相担体を用いる、核酸オリゴマーの合成方法に係る。



WO 2005/080411 A1



LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI,
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU,

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

ホスホロアミダイトを含む3'末端ヌクレオシドユニット

技術分野

- [0001] 本発明は、本発明者が開発した塩基部無保護ホスホロアミダイト法で有利に使用することが出来る、ホスホロアミダイトを含む3'末端ヌクレオシドユニットに関する。

背景技術

- [0002] 従来のDNA合成では、3'末端ヌクレオシドの固相への導入は3'末端ヌクレオシドにサクシネートリンカーやシリル系のリンカーを使って、固相上のアミノ基とアミド結合を構築することによってなされていた。
- [0003] 例えば、中性条件で切り出しができるシリルリンカーとして、本発明者の一人である関根が開発した安息香酸型化合物である $iP_2Si-C_6H_4-C(O)-$ 型のものが知られていた(非特許文献1)。しかし、このようなシリルリンカーを用いる場合にはアシル化反応によって固相担体のアミノ基に導入されるために、3'末端ヌクレオシドがdA, dC及びdGの場合にはそれら塩基に含まれるアミノ基をDMTr等の適切な保護基で予め保護する必要があった。
- [0004] 又、dCの塩基部にあるDMTr保護基は比較的安定なために、5%トリフルオロ酢酸 $-CH_2Cl_2$ 溶液で30分間処理しないと完全に脱保護することが出来なかった。ところが、このような強い酸性条件においては、シリルリンカーとシリルリンカーと合成されたDNAオリゴマー間のSiO結合が開裂してしまう可能性がある。
- [0005] 非特許文献1: Wada, T.; Mochizuki, A.; Sato, T.; Seike, M., Tetrahedron Letters, 1998, 39, 5593-5596

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0006] 従って、本発明は、DNAの鎖長伸長反応と全く同一の条件で、任意の塩基を含む3'末端ヌクレオシドを固相上の水酸基に結合する方法を提供することを目的とする。即ち、発明者は、DNA鎖長伸長反応は100%近い反応効率で行えることから、この3'末端ヌクレオシドの固相への導入反応も同じ条件で行えるように鋭意研究の結果

、従来の3'末端ヌクレオシド成分にシリルリンカー及びホスホロアミダイト基を導入することによってこの課題を解決し、本発明を完成した。

課題を解決するための手段

[0007] 即ち、本発明は、以下の一般式(I)で示される化合物である、ホスホロアミダイトを含む3'末端ヌクレオシドユニット:



(式中、(N)は任意のヌクレオシド又はその誘導体であり、R1、R2、R4及びR5はアルキル基又はアリール基であり、R3はリン酸基の保護基であり、nは1〜5の整数である)に係る。

[0008] 更に本発明は、この3'末端ヌクレオシドユニットが、例えば、20〜30 μ mol/gの割合で導入されている固相担体、及び、この固相担体を用いる核酸オリゴマーの合成方法、特に、アルコール型化合物、又はアルコール型化合物及び酸触媒の混合物を活性化剤として使用するホスホロアミダイト法にも係る。

発明の効果

[0009] 本発明のホスホロアミダイトを含む3'末端ヌクレオシドユニットを用いることによって、水酸基を表面にもつ固相担体も利用できるようになった。このホスホロアミダイトユニットを用いてDNAが固相上で合成した場合には従来型のものと比べアンモニアなどの塩基性でもDNAは切り出されない。更に、本発明者が開発した塩基部無保護ホスホロアミダイト法でこのシリルリンカーを含むホスホロアミダイトユニットを使用すれば、ヌクレオシドを固相担体に導入する際の核酸塩基部の保護基は一切必要とされない。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]DNAオリゴマーの陰イオン交換HPLCチャートを示す。

発明を実施するための最良の形態

[0011] シリル基上には当業者に公知の任意の置換基であるR1及びR2があってもよく、例えば、炭素原子数1〜5を有するアルキル基、又は、任意の位置で該アルキル基、ニトロ基、シアノ基、ハロゲン基、又はアルコキシ基で置換されていても良い、ベンジル

基、フェニル基、及びナフチル基のようなアリール基を挙げることが出来る。

- [0012] 又、リン酸基の保護基としては当業者に公知の任意の置換基を使用することが出来る、例えば、2-シアノエチル基、4-ニトロフェニルエチル基、N-(トリフルオロアセチル)アミノブチル基、又は、4-[N-メチルーN-(2, 2, 2-トリフルオロアセチル)アミノ]ブチル基が好適である。
- [0013] R4及びR5はアルキル基、特に炭素数1〜4のアルキル基、ベンジル基、フェニル基、及びナフチル基のようなアリール基であり、イソプロピル基が好ましい。
- [0014] 更に、本発明化合物のベンゼン環骨格は当業者に公知の任意の置換基を有するものであっても良い。かかる置換基の例として、炭素原子数1〜4を有するアルキル基、ハロゲノ基、ニトロ基、シアノ基、又はメキシ基を挙げることが出来る。尚、 $-(CH_2)_n-$ とSiはベンゼン環骨格にパラの位置で結合している。
- [0015] 本発明の化合物は、本明細書、特に以下の実施例の記載等を参照することによって、当業者であれば容易に合成することが出来る。また、本明細書に記載されていない諸条件は当業者が適宜選択することができる。

実施例

- [0016] 以下、実施例に則して本発明を更に詳しく説明する。尚、本発明の技術的範囲は以下の実施例によって何ら制限されるものではない。
- [0017] 4-ジイソプロピルシラニル安息香酸メチルエステル(2)
 4-ジイソプロピルシラニル安息香酸1 (9 g, 38 mmol)をメタノール300 mLに溶かし、氷冷下conc.H₂SO₄ 15 mLを滴下した。2時間の加熱還流のち、反応溶液を500 mLのクロロホルムに溶解した。水 300 mLで二回、5wt%-炭酸水素ナトリウム水溶液300 mLで3回抽出操作を行った。さらに、有機層を回収し無水硫酸ナトリウムで乾燥してろ過し、溶媒を減圧留去させた。この粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、ヘキサンに0-5%酢酸エチルのグラジエントをかけて溶出し、溶媒を留去し目的物を得た(8.8 g, 93%)。
- [0018] ¹H NMR (CDCl₃): 0.93-1.06 (m, 12H), 1.18-1.27 (m, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.96 (t, 1H, J = 3.2 Hz), 7.58 (d, 2H, J = 8.1 Hz), 7.98 (d, 2H, J = 8.1 Hz).
¹³C NMR (CDCl₃): 10.6, 18.5, 18.6, 52.2, 128.1, 128.2, 128.3, 130.5, 140.6, 167.1.

[0019] 4-(ヒドロキシメチル)フェニル-ジイソプロピルシラン(3)

LiAlH₄ (1.2 g, 32 mmol)を無水THF 80 mLに溶解し、4-ジイソプロピルシラニル安息香酸メチルエステル2 (8 g, 32 mmol)の無水THF溶液 80 mLをゆっくり滴下した。滴下後、10分間攪拌をおこない、酢酸エチル20 mLをゆっくり加えた。反応系をジクロロメタン500 mLで希釈した後、0.2 N の塩酸水溶液400mLを用いて3回抽出を行った。さらに、有機層を回収し無水硫酸ナトリウムで乾燥してろ過し、溶媒を減圧留去させて目的化合物を得た(7.2 g, quant)。

[0020] ¹H NMR (CDCl₃): 1.02 (2d, 12H, J = 7.3 Hz), 1.17–1.23 (m, 2H), 3.09 (brs. 1H), 3.94 (t, 1H, J = 3.2 Hz), 4.58 (s, 2H), 7.29 (d, 2H, J = 7.6 Hz), 7.48 (d, 2H, J = 7.6 Hz).

¹³C NMR (CDCl₃): 10.7, 18.4, 18.6, 64.8, 126.0, 132.9, 135.4, 141.6.

[0021] 4-(アセトキシメチル)フェニル-ジイソプロピルシラン(4)

4-(ヒドロキシメチル)フェニル-ジイソプロピルシラン3 (4.9 g, 22 mmol)を溶解したピリジン100 mLに、アルゴン下、無水酢酸 (3.1 mL, 33 mmol) と4-N,N-ジメチルアミノピリジン (7.3 mg, 6 mmol) を加えた。室温で2時間攪拌後、メタノール20 mLを加えた。その後、反応系を400 mLの酢酸エチルで希釈し、飽和食塩水300 mLを用いて三回洗浄した。続いて、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥してろ過し、溶媒を減圧留去させた。最後に、目的物を液体として得た(5.4 g, 93%)。

[0022] ¹H NMR (CDCl₃): 1.03 (2d, 12H, J = 7.0 Hz), 1.20–1.24 (m, 2H), 2.09 (s. 3H), 3.96 (t, 1H, J = 3.1 Hz), 5.10 (s, 2H), 7.32 (d, 2H, J = 8.1 Hz), 7.51 (d, 2H, J = 8.1 Hz).

¹³C NMR (CDCl₃): 10.7, 18.4, 18.6, 20.9, 66.1, 127.1, 134.0, 135.5, 136.5, 170.4.

[0023] 5'-[O-(4,4'-ジメトキシトリチル)], 3'-[O-4-(アセトキシメチル)フェニル-ジイソプロピルシリル] チミジン(5t)

4-(アセトキシメチル)フェニル-ジイソプロピルシラン4 (508 mg, 1.9 mmol)を無水CH₂Cl₂ 10mLに溶解し、1,3-ジクロロ-4,4'-ジメチルヒダントイン (761 mg, 3.9 mmol)を加えた。室温30分の攪拌の後、この反応溶液を5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)チミジン (954 mg, 1.8 mmol)とイミダゾール (595 mg, 8.8 mmol)を溶解させた無水CH₂Cl₂ 10mLに加えた。室温で30分攪拌後、水 (5 mL) を加えた。5分後、クロロホルム(100

mL)で希釈後、5wt%-炭酸水素ナトリウム水溶液100mlで3回抽出操作を行った。さらに、有機層を回収し無水硫酸ナトリウムで乾燥してろ過し、溶媒を減圧留去させた。この粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (1%ピリジン) により精製し、ヘキサンに50-100%クロロホルム、クロロホルムに0-3%メタノールのグラジエントをかけて溶出し、溶媒を留去し目的物を得た(1.1 g, 75%)。

[0024] ^1H NMR (CDCl_3): 0.95-1.07 (m, 12H), 1.18-1.26 (m, 2H), 1.53 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 2.27-2.31 (m, 1H), 2.48-2.56 (m, 1H), 3.39 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz), 3.50 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz), 3.75 (s, 6H), 4.16 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz), 4.67 (d, 1H, $J = 5.7$ Hz), 5.11 (s, 2H), 6.51 (t, 1H, $J = 4.1$ Hz), 6.82 (dd, 4H, $J = 2.4$ Hz, $J = 8.9$ Hz), 7.18-7.67 (m, 14H), 10.3 (brs, 1H).

^{13}C NMR (CDCl_3): 11.7, 11.8, 11.9, 12.4, 16.8, 17.1, 17.16, 17.19, 17.21, 20.7, 41.6, 54.9, 63.1, 65.8, 73.1, 77.2, 84.7, 86.6, 86.8, 110.8, 112.9, 123.4, 124.9, 126.7, 126.9, 127.1, 127.6, 127.7, 127.8, 129.7, 133.3, 134.1, 134.4, 134.97, 135.01, 135.2, 135.7, 136.5, 143.9, 149.1, 150.3, 158.3, 163.9, 170.4.

MS m/z calcd for $\text{M}+\text{Na}$; 829.3496. Found; 829.3452

[0025] 5'-[O-(4,4'-ジメトキシトリチル)], 3'-[O-4-(アセトキシメチル)フェニル-ジイソプロピルシリル], 2-デオキシアデノシン (5a)

4-(アセトキシメチル)フェニル-ジイソプロピルシリラン4 (420 mg, 1.6 mmol)を無水 CH_2Cl_2 8 mLに溶解し、1,3-ジクロロ-4,4-ジメチルヒダントイン (629 mg, 3.2 mmol)を加えた。室温30分の攪拌の後、この反応溶液を5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-デオキシアデノシン (796 mg, 1.4 mmol)とイミダゾール (489 mg, 7.2 mmol)を溶解させた無水 CH_2Cl_2 8 mLに加える。室温で30分攪拌後、水 (5 mL) を加えた。5分後、クロロホルム(100 mL)で希釈後、5wt%-炭酸水素ナトリウム水溶液100mlで3回抽出操作を行った。さらに、有機層を回収し無水硫酸ナトリウムで乾燥してろ過し、溶媒を減圧留去させた。この粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (1%ピリジン) により精製し、ヘキサンに50-100%クロロホルム、クロロホルムに0-3%メタノールのグラジエントをかけて溶出し、溶媒を留去し目的物を得た(850 mg, 72%)。

[0026] ^1H NMR (CDCl_3): 0.98-1.07 (m, 12H), 1.22-1.31 (m, 2H), 2.11 (s, 3H), 2.48-2.55

(m, 1H), 2.75–2.89 (m, 1H), 3.31 (d, 1H, J = 4.6 Hz), 3.38 (d, 1H, J = 4.6 Hz), 3.76 (s, 6H), 4.28 (d, 1H, J = 2.4 Hz), 4.67 (t, 1H, J = 2.6 Hz), 5.10 (s, 2H), 6.09 (s, 1H), 6.50 (dd, 1H, J = 5.9 Hz, J = 7.3 Hz), 6.76 (d, 4H, J = 8.6 Hz), 7.17–7.38 (m, 11H), 7.50 (d, 2H, J = 7.3 Hz), 7.99 (s, 1H), 8.28 (s, 1H).

^{13}C NMR (CDCl_3): 12.1, 12.2, 17.4, 21.0, 40.9, 55.2, 63.5, 66.1, 73.5, 84.5, 86.4, 87.1, 112.9, 113.0, 119.9, 126.7, 127.2, 127.7, 128.0, 129.9, 133.7, 134.6, 135.48, 135.51, 137.0, 138.8, 144.3, 149.4, 152.6, 155.3, 158.3, 170.6

MS m/z calcd for M+H; 816.3793. Found; 816.3711.

[0027] 5'-[O-(4,4'-ジメトキシトリチル)], 3'-[O-4-(ヒドキシメチル)フェニル-ジイソプロピルシリル] チミジン (6t)

5'-[O-(4,4'-ジメトキシトリチル)], 3'-[O-4-(アセトキシメチル)フェニル-ジイソプロピルシリル] チミジン 5t (925 mg, 1.2 mmol) を tBuNH_2 -MeOH (1:4, v/v, 20 mL) で室温、三時間処理した。その後、クロロホルム 100 mL で希釈し、飽和食塩水 100 mL で 3 回抽出操作をおこなった。さらに、有機層を回収し無水硫酸ナトリウムで乾燥してろ過し、溶媒を減圧留去させた。この粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (1%ピリジン) により精製し、ヘキサンに 50–100% クロロホルム、クロロホルムに 0–3% メタノールのグラジエントをかけて溶出し、溶媒を留去し目的物を得た (781 mg, 89%)。

[0028] ^1H NMR (CDCl_3): 0.92–1.00 (m, 12H), 1.17–1.25 (m, 2H), 1.56 (s, 3H), 2.15–2.38 (m, 1H), 2.53–2.68 (m, 1H), 3.31 (dd, 1H, J = 2.7 Hz, J = 10.5 Hz), 3.43 (dd, 1H, J = 2.7 Hz, J = 10.5 Hz), 3.77 (s, 6H), 4.12 (d, 1H, J = 2.4 Hz), 4.63 (t, 1H, J = 2.7 Hz), 4.67 (d, 1H, J = 5.7 Hz), 6.44 (dd, 1H, J = 5.9 Hz, J = 7.3 Hz), 6.77 (dd, 4H, J = 2.4 Hz, J = 8.9 Hz), 7.19–7.35 (m, 11H), 7.44 (d, 2H, J = 7.8 Hz), 7.61 (s, 1H), 8.15 (brs, 1H).

^{13}C NMR (CDCl_3): 12.0, 17.4, 41.8, 55.2, 63.3, 64.9, 73.3, 84.8, 86.8, 87.1, 111.0, 113.1, 126.1, 126.9, 127.8, 129.8, 129.9, 132.4, 134.5, 135.0, 135.2, 135.5, 142.2, 144.1, 150.3, 158.4, 163.9.

MS m/z calcd for M+H; 787.3391. Found; 787.3413.

[0029] 5'-[O-(4,4'-ジメトキシトリチル)], 3'-[O-4-(ヒドキシメチル)フェニル-ジイソプロピル

シリル] 2'-デオキシアデノシン(6a)

5'-[O-(4,4'-ジメトキシトリチル)], 3'-[O-4-(アセトキシメチル)フェニル-ジイソプロピルシリル] 2'-デオキシアデノシン5a (610 mg, 0.75 mmol)を $t\text{BuNH}_2$ -MeOH (1:4, v/v, 15 mL) で室温、三時間処理した。その後、クロロホルム100 mLで希釈し、飽和食塩水100mlで3回抽出操作をおこなった。さらに、有機層を回収し無水硫酸ナトリウムで乾燥してろ過し、溶媒を減圧留去させた。この粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (1%ピリジン) により精製し、ヘキサンに50-100%クロロホルム、クロロホルムに0-3%メタノールのグラジエントをかけて溶出し、溶媒を留去し目的物を得た(530 mg, 92%)。

- [0030] ^1H NMR (CDCl_3): 0.93-1.03 (m, 12H), 1.20-1.29 (m, 2H), 2.48-2.55 (m, 1H), 2.75-2.89 (m, 1H), 3.22 (dd, 1H, $J = 4.1$ Hz, $J = 10.3$ Hz), 3.39 (dd, 1H, $J = 4.1$ Hz, $J = 10.3$ Hz), 3.73 (s, 6H), 4.21 (d, 1H, $J = 3.8$ Hz), 4.69 (s, 3H), 6.01 (s, 2H), 6.50 (t, 1H, $J = 6.2$ Hz), 6.74 (d, 4H, $J = 8.9$ Hz), 7.13-7.33 (m, 11H), 7.50 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz), 7.81 (s, 1H), 8.26 (s, 1H).
- ^{13}C NMR (CDCl_3): 12.2, 12.3, 17.46, 17.51, 17.55, 17.6, 40.8, 55.2, 63.2, 64.9, 73.0, 77.2, 84.2, 86.4, 86.7, 113.0, 119.8, 123.6, 126.3, 126.7, 127.7, 128.0, 128.1, 128.9, 129.87, 129.9, 132.6, 134.7, 135.5, 135.6, 135.8, 138.7, 142.5, 144.4, 149.5, 149.6, 152.8, 155.3, 158.3.
- MS m/z calcd for $\text{M}+\text{H}$; 774.3687. Found; 774.3747.

- [0031] 5'-[O-(4,4'-ジメトキシトリチル)], 3'-O-[4-O-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピルホスホロアミダイト)ベンジル-ジイソプロピルシリル] チミジン(7t)

5'-[O-(4,4'-ジメトキシトリチル)], 3'-[O-4-(ヒドキシメチル)フェニル-ジイソプロピルシリル] チミジン6t (770 mg, 1.0 mmol)をピリジン、トルエン、ジクロロメタンの順で共沸して脱水後、無水THF(10 mL)に溶解させたのち、ジイソプロピルエチルアミン(242 μ L, 1.1 mmol)と(2-シアノエチル)(N,N-ジイソプロピルアミノ)クロロホスフィン(242 μ L, 1.5mmol)を加えた。30分間攪拌した後、反応溶液を水 (20 mL) にあけてから、クロロホルム200mlで希釈し、飽和塩化ナトリウム水溶液200mlで3回抽出操作を行った。有機層を回収し無水硫酸ナトリウムで乾燥してろ過し、溶媒を減圧留去させた。この粗

生成物をシリカゲルクロマトグラフィー(1% トリエチルアミン)により精製し、ヘキサンに50-100%クロロホルム、続いてクロロホルムに0-3%メタノールのグラジエントをかけて溶出し、溶媒を留去し目的の白色固体を得た(850 mg, 88%)。

[0032] ^1H NMR (CDCl_3): 0.94-1.06 (m, 12H), 1.17-1.29 (m, 15H), 1.50 (s, 3H), 2.13-2.30 (m, 1H), 2.35-2.48 (m, 1H), 2.60 (t, 2H, $J = 6.3$ Hz), 3.27 (dd, 1H, $J = 2.7$ Hz, $J = 10.5$ Hz), 3.45 (dd, 1H, $J = 2.7$ Hz, $J = 10.5$ Hz), 3.61-3.87 (m, 10H), 4.14 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz), 4.65-4.76 (m, 3H), 6.48 (dd, 1H, $J = 5.7$ Hz, $J = 7.8$ Hz), 6.80 (dd, 4H, $J = 2.4$ Hz, $J = 8.9$ Hz), 7.21-7.37 (m, 11H), 7.46 (d, 2H, $J = 7.6$ Hz), 7.63 (s, 1H), 9.45 (brs, 1H).

^{13}C NMR (CDCl_3): 11.8, 11.9, 12.0, 12.4, 16.9, 17.1, 17.27, 17.32, 17.4, 20.3, 20.4, 22.8, 22.90, 22.94, 24.47, 24.55, 24.57, 24.7, 41.7, 43.0, 43.2, 45.2, 45.3, 55.1, 58.3, 58.5, 63.3, 65.0, 65.3, 67.8, 73.2, 77.2, 84.8, 86.7, 87.0, 110.9, 113.01, 113.04, 117.4, 126.0, 126.1, 126.8, 127.7, 127.8, 129.76, 129.80, 132.3, 134.0, 134.3, 135.0, 135.2, 135.4, 140.2, 140.3, 144.0, 150.2, 158.4, 163.8.

^{31}P NMR (CDCl_3): 149.3

[0033] 5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル), 3'-O-[4-O-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピルホスホロアミダイト)ベンジル-ジイソプロピルシリル] 2'-デオキシアデノシン (7a)

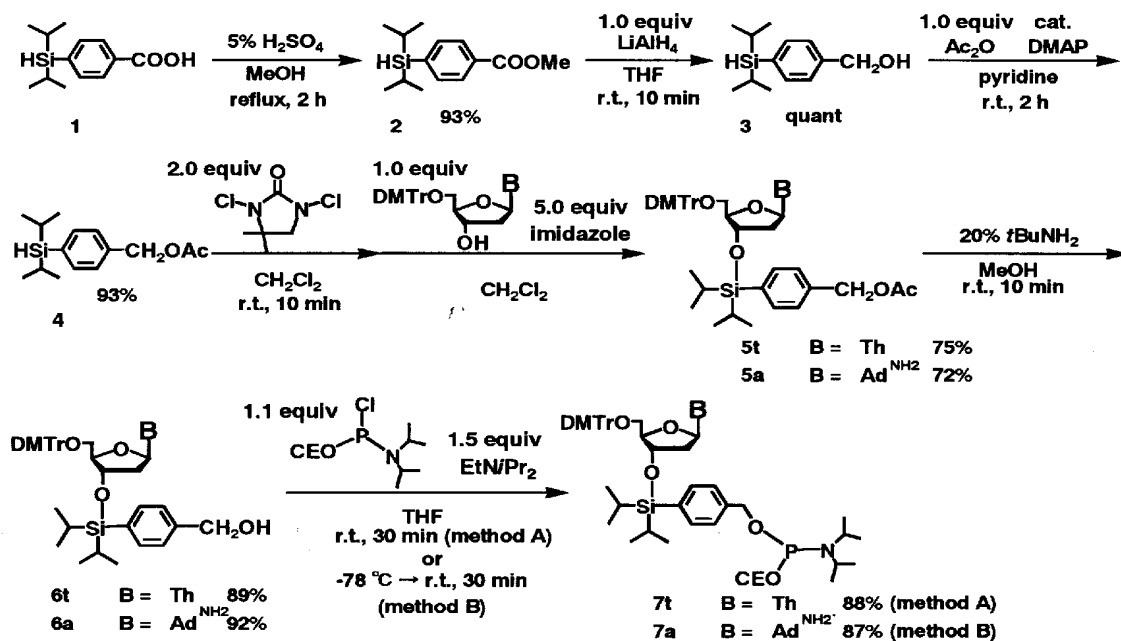
5'-[O-(4,4'-ジメトキシトリチル)], 3'-[O-4-(ヒドキシメチル)フェニル-ジイソプロピルシリル] 2'-デオキシアデノシン6a (450 mg, 0.58 mmol)をピリジン、トルエン、ジクロロメタンの順で共沸して脱水後、無水THF (6 mL) に溶解させたのち、ジイソプロピルエチルアミン(141 μl , 0.64 mmol)を加えた。この溶液を-78℃まで冷却し、(2-シアノエチル)(N,N-ジイソプロピルアミノ)クロロホスフィン(141 μl , 0.87 mmol)を加えてから、徐々に室温までもどした。30分間攪拌した後、反応溶液を水(20ml)にあけてから、クロロホルム200mlで希釈し、飽和塩化ナトリウム水溶液200mlで3回抽出操作を行った。有機層を回収し無水硫酸ナトリウムで乾燥してろ過し、溶媒を減圧留去させた。この粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー(1% トリエチルアミン)により精製し、ヘキサンに50-100%クロロホルム、続いてクロロホルムに0-3%メタノールのグラジエントをかけて溶出し、溶媒を留去し目的の白色固体を得た(500 mg, 87%)。

[0034] ^1H NMR (CDCl_3): 0.98–1.05 (m, 12H), 1.16–1.29 (m, 15H), 2.48–2.69 (m, 3H), 2.72–2.87 (m, 1H), 3.31 (dd, 1H, $J = 4.1$ Hz, $J = 10.3$ Hz), 3.39 (dd, 1H, $J = 4.1$ Hz, $J = 10.3$ Hz), 3.60–3.86 (m, 10H), 4.28 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz), 4.67–4.78 (m, 3H), 6.06 (s, 2H), 6.51 (t, 1H, $J = 6.4$ Hz), 6.77 (d, 4H, $J = 8.6$ Hz), 7.18–7.38 (m, 11H), 7.49 (d, 2H, $J = 7.0$ Hz), 7.98 (s, 1H), 8.28 (s, 1H).

^{13}C NMR (CDCl_3): 12.2, 12.3, 17.46, 17.51, 17.55, 17.6, 40.8, 55.2, 63.2, 64.9, 73.0, 77.2, 84.2, 86.4, 86.7, 113.0, 119.8, 123.6, 126.3, 126.7, 127.7, 128.0, 128.1, 128.9, 129.87, 129.9, 132.6, 134.7, 135.5, 135.6, 135.8, 138.7, 142.5, 144.4, 149.5, 149.6, 152.8, 155.3, 158.3.

^{31}P NMR (CDCl_3): 149.3.

[0035] [化1]



[0036] トリエチルアンモニウム, O-(4,4'-ジメトキシトリチル)酢酸(9)

ヒドロキシ酢酸 (760 mg, 10 mmol) と トリエチルアミン (1.45 mL, 11 mmol) を溶解させたピリジン溶液 100 mL に 4, 4'-ジメトキシトリチルクロライドを加えた。室温、24時間攪拌し、20 mL のメタノールを加えた。クロロホルム 500 mL で希釈し、0.5 M の炭酸トリエ

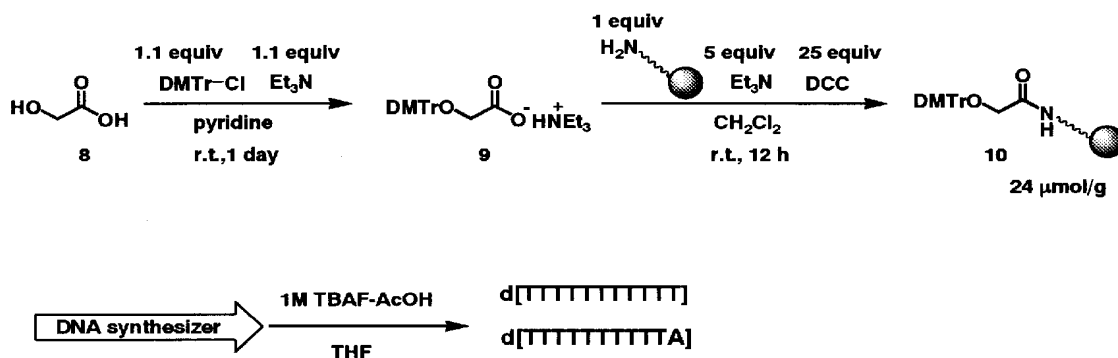
チルアンモニウムバッファー300 mLを用いて3回抽出をおこなった。さらに、有機層を回収し無水硫酸ナトリウムで乾燥してろ過し、溶媒を減圧留去させた。この粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、クロロホルムに0-3%メタノールのグラジエントをかけて溶出し、溶媒を留去し目的物を得た(3.5 g, 73%)。

[0037] ^1H NMR (CDCl_3): 1.15 (t, 9H, $J = 7.3$ Hz), 2.97 (dd, 6H, $J = 7.0$ Hz, $J = 14.9$ Hz), 3.55 (s, 2H), 3.64 (s, 6H), 6.77 (dd, 4H, $J = 2.4$ Hz, $J = 7.0$ Hz), 7.06–7.17 (m, 3 H), 7.39 (dd, 4H, $J = 2.0$ Hz, $J = 7.4$ Hz), 7.43 (d, 2H, $J = 1.4$ Hz).

[0038] 固相担体(10)の調製

十分乾燥させたハイリークロスリンクポリスチレン固相担体 (500mg 17 μmol)、トリエチルアンモニウム、O-(4,4'-ジメトキシトリチル)酢酸3-18 (260 μmol) そしてDCC (268 1.3mmol) をジクロロメタン (5 mL)に溶かし、室温12時間攪拌した。反応後、固相担体をろ過し、アセトニトリルでの洗浄・乾燥を行った後、無水酢酸 (0.5ml)とDMAP (5 mg) をピリジン (4.5 mL) に溶かした溶液に加えた。3時間攪拌を行った後、固相担体を再度ろ過し、アセトニトリルで洗浄した。固相担体への導入量は、トリチル基の比色定量より求めた(24 $\mu\text{mol/g}$)。

[0039] [化2]



[0040] シリルリンカーを用いたDNA合成

d[TTTTTTTTTTTT]およびd[TTTTTTTTTTTA]の合成には、Applied Biosystem Inc.(ABI) のDNA/RNA Synthesizer 392を使用した。DNAオリゴマーの自動合成機に

よる合成は、HCP固相担体3-19 (1 μ mol, 24 μ mo/g)とシリルリンカーを含むホスホロアミダイトユニット7tもしくは7a、チミジン3'ホスホロアミダイトユニットを用いて行った。合成各鎖伸長サイクルは、以下の表1に示すとおりである。

[0041] [表1]

step	operation	Reagent(s)	time, (min)
1	washing	CH ₃ CN	0.2
2	deprotection	3% Cl ₃ CCOOH / CH ₂ Cl ₂	1.5
3	washing	CH ₃ CN	0.4
4	coupling	0.1M amidite + 0.2M HO ^t Bt in CH ₃ CN-NMP (15:1, v/v)	1.0
5	washing	CH ₃ CN	0.2
6	coupling	0.1M amidite + 0.2M HO ^t Bt in CH ₃ CN-NMP (15:1, v/v)	1.0
7	washing	CH ₃ CN	0.2
8	oxidation	0.1M I ₂ in Py-H ₂ O-THF (20:2:78, v/v/v)	0.5
9	washing	CH ₃ CN	0.4

[0042] 続いて、DMTr基を1分間の3% trichloroacetic acid in CH₂Cl₂ (2 mL)で除去し、CH₂Cl₂ (1 mL x 3), CH₃CN (1 mL x 3)で固相担体を洗浄した。その後、10% DBU in CH₃CN (500 μ L) でシアノエチル基を除去した。CH₃CN (1 mL x 3)で固相担体を洗浄した後に、TBAF (131 mg, 0.5 mmol) と酢酸 (24 μ L, 0.5mmol) を無水THF μ に溶かした反応溶液で固相担体を1時間処理し、DNAオリゴマーの切り出しを行った。得られた混合溶液をSep-Pak C18カートリッジを用いて脱塩をおこない目的物を得た。

産業上の利用可能性

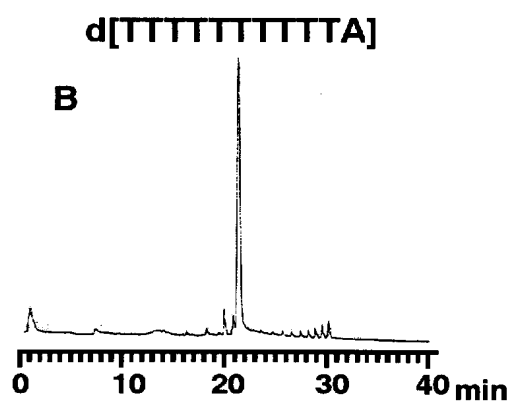
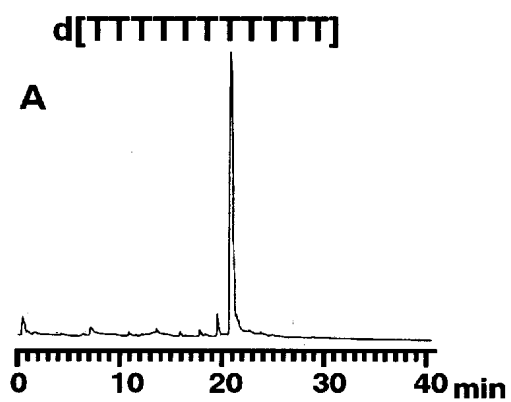
[0043] 本発明のホスホロアミダイトを含む3'末端ヌクレオシドユニットを用いることによって、様々な固相素材を選択できるようになり、固相を直接チップとして用いたりするハイスループットDNAチップ合成も可能になるものと思われる。

請求の範囲

- [1] 以下の一般式(I)で示される化合物である、ホスホロアミダイトを含む3'末端ヌクレオシドユニット:
- $$(N)-O-(R1)Si(R2)-(C_6H_4)-(CH_2)_n-O-P(OR3)N(R4)(R5) \quad (I)$$
- (式中、(N)は任意のヌクレオシド又はその誘導体であり、R1、R2、R4及びR5は、アルキル基、又はアリール基であり、R3はリン酸基の保護基であり、nは1〜5の整数である)
- [2] R1及びR2が炭素原子数1〜5を有するアルキル基である、請求項1記載の化合物。
- [3] R1及びR2のアリール基が、アルキル基、ニトロ基、シアノ基、ハロゲノ基、又はメキシ基で置換されている、請求項1記載の化合物。
- [4] リン酸基の保護基が2-シアノエチル基、4-ニトロフェニルエチル基、N-(トリフロロアセチル)アミノブチル基、又は、4-[N-メチル-N-(2, 2, 2-トリフルオロアセチル)アミノ]ブチル基である、請求項1〜3のいずれか一項に記載の化合物。
- [5] リン酸基の保護基が2-シアノエチル基である、請求項4のいずれか一項に記載の化合物。
- [6] R4及びR5は炭素数1〜4のアルキル基、ベンジル基、フェニル基、又はナフチル基である、請求項1〜5のいずれか一項に記載の化合物。
- [7] R4及びR5はイソプロピル基である、請求項6記載の化合物。
- [8] ベンゼン環骨格が置換基を有する、請求項1〜7のいずれか一項に記載の化合物。
- [9] ベンゼン環骨格の置換基が炭素原子数1〜4を有するアルキル基、ハロゲノ基、ニトロ基、シアノ基、又はメキシ基から成る群から選択される、請求項8記載の化合物。
- [10] 5'-[O-(4,4'-ジメキシトリチル)], 3'-O-[4-O-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピルホスホロアミダイト)ベンジルージイソプロピルシリル] チミジンである請求項1記載の化合物。
- [11] 5'-O-(4,4'-ジメキシトリチル), 3'-O-[4-O-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピルホスホロアミダイト)ベンジルージイソプロピルシリル] 2'-デオキシアデノシンである請求項1記載の化合物。
- [12] 請求項1〜11のいずれか一項に記載された化合物である3'末端ヌクレオシドユニット

トが導入されている固相担体。

- [13] 3'末端ヌクレオシドユニットが20–30 μ mol/gの割合で導入されている、請求項12記載の固相担体。
- [14] HCP固相担体である、請求項12又は13記載の固相担体。
- [15] 請求項12、13又は14に記載の固相担体を用いる、核酸オリゴマーの合成方法。
- [16] アルコール型化合物、又はアルコール型化合物及び酸触媒の混合物を活性化剤として使用するホスホロアミダイト法である、請求項15記載の合成方法。

[1]

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/002058

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07H21/04, C07F9/6588, 9/6561, C12N15/11

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07H21/04, C07F9/6588, 9/6561, C12N15/11

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2002/20543 A2 (AVENCIA LTD.), 14 March, 2002 (14.03.02), Claims & AU 2001/84268 A & EP 1317466 A2 & US 2003/229218 A1 & KR 2003/81303 A & JP 2004-508379 A & CN 1471537 A	1-16
A	WADA, T. et al., "Functionalization of Solid Supports with N-Unprotected Deoxyribonucleosides," Tetrahedron Letters, 1998, Vol.39, pages 5593 to 5596	1-16
A	JP 07-112997 A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 02 May, 1995 (02.05.95), Claims & CA 2129565 A & EP 653438 A2	1-16

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 March, 2005 (14.03.05)

Date of mailing of the international search report

29 March, 2005 (29.03.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07H21/04, C07F9/6588, 9/6561, C12N15/11

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07H21/04, C07F9/6588, 9/6561, C12N15/11

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 2002/20543 A2, (AVENCIA LIMITED) 2002.03.14 特許請求の範囲 & AU 2001/84268 A & EP 1317466 A2 & US 2003/229218 A1 & KR 2003/81303 A & JP 2004-508379 A & CN 1471537 A	1-16

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14.03.2005

国際調査報告の発送日

29.3.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

原田 隆興

4P

9167

電話番号 03-3581-1101 内線 3490

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Wada T. et al, "Functionalization of Solid Supports with N- Unprotected Deoxyribonucleosides," Tetrahedron Letters, 1998, Vol. 39, p. 5593-5596	1-16
A	JP 07-112997 A, (武田薬品工業株式会社) 1995. 05. 02 特許請求の範囲 & CA 2129565 A & EP 653438 A2	1-16